

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Patentschrift**
⑪ **DE 37 42 292 C 1**

⑤① Int. Cl. 4:
B01D 57/02
G 01 N 27/28

⑳ Aktenzeichen: P 37 42 292.8-45
㉑ Anmeldetag: 14. 12. 87
㉒ Offenlegungstag: —
㉓ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 1. 6. 89

DE 37 42 292 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:
Stichlmair, Johann, Prof. Dr.-Ing., 4300 Essen, DE

⑦② Erfinder:
gleich Patentinhaber

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

DE 25 20 940 C2
DE-OS 14 42 416

GB-B.: BIER, M.: Elektrophoresis: Theory, Methods
and Applications, Academic Press Inc., London 1973;
DE-B.: HANNING, K.: Habilitations- schrift,
Ludwig-Maximilians-Uni- versität, München 1964;
DE-B.: JORDAN, H.L.: Weltraumfor- schung, DFVLR,
Köln-Porz 1984;

⑤④ Verfahren und Vorrichtung zur Zweiphasen-Elektrophorese

Die Elektrophorese kann bisher nur in unzureichender Weise zur Zerlegung von Stoffgemischen genutzt werden, da thermische Konvektionsströme die Wanderung der Substanzen behindern. Durch das neuartige Verfahren soll die Elektrophorese so modifiziert werden, daß die Trennleistung durch thermische Konvektionsströme nicht mehr vermindert wird.

Im Trennraum befinden sich mindestens zwei miteinander nicht vollständig mischbare Flüssigkeiten. Anode und Kathode sind in unterschiedlichen Flüssigkeiten angeordnet, so daß der Stofftransport unter der Wirkung des elektrischen Feldes über die Phasengrenze erfolgt. Die zweite Flüssigkeit hat dabei die Aufgabe, die wandernden Teilchen (Moleküle) einzufangen und eine Rückwanderung in die ursprüngliche Flüssigkeit zu verhindern.

Das neue Trennverfahren läßt sich in unterschiedlicher Weise technisch durchführen. Möglich ist eine diskontinuierliche, eine halbkontinuierliche und eine kontinuierliche Betriebsweise mit Gleich- bzw. Gegenstromführung der Flüssigkeiten. Auch ein chromatographieartige Trennung kann durchgeführt werden.

DE 37 42 292 C 1

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Stofftrennung mittels Elektrophorese sowie auf eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

Als Elektrophorese wird die Wanderung von Molekülen oder Teilchen unter der Wirkung eines elektrischen Feldes bezeichnet. In der technischen Ausführung wird durch Anlegen einer elektrischen Spannung zwischen Kathode und Anode, welche sich in einer Flüssigkeit befinden, ein elektrisches Feld erzeugt, so daß elektrisch geladene Moleküle oder Teilchen in der Flüssigkeit wandern. In Abhängigkeit von der jeweiligen Wanderungsgeschwindigkeit und Wanderungsrichtung unterschiedlicher Spezies kann so eine Abtrennung einzelner Substanzen aus einem Gemisch erreicht werden.

Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung der sogenannten "Trägerfreien-Elektrophorese". Hierbei durchströmt eine Pufferlösung 10 die Trennkammer 0 quer zu den Kraftlinien eines elektrischen Feldes, das von den beiden Elektroden 2 und 3 erzeugt wird. Das zu zerlegende Flüssigkeitsgemisch 11 wird möglichst punktförmig in die Trennkammer eingeleitet. Substanzen mit unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit werden in unterschiedlichem Ausmaß in Richtung der Kraftlinien des elektrischen Feldes abgelenkt und können am Ende des Trennraumes an verschiedenen Stellen 15, 16, 17, oder 18 abgezogen werden.

Eine grundlegende Voraussetzung für die effektive Durchführung einer Stofftrennung mittels Elektrophorese ist, daß innerhalb der Trennkammer keinerlei Vermischungsvorgänge stattfinden. Die Pufferlösung sollte also möglichst völlig unbewegt sein oder zumindest vollkommen laminar, d.h. ohne turbulente Quervermischungen, die Kammer durchströmen. Dieser Forderung stehen folgende Schwierigkeiten entgegen:

- Aufgrund des hohen Stromflusses zwischen den Elektroden kommt es zu einer starken Erwärmung der Flüssigkeit. Dabei bilden sich in der Kammer lokale Temperaturunterschiede aus, die wegen der damit verbundenen Dichteänderungen freie Konvektionsströme auslösen. Diese thermische Konvektion ist sehr viel stärker als die elektrophoretische Bewegung, so daß sie die Trennung entscheidend behindert und unter Umständen gänzlich zunichte machen kann.

- Bei der Strömung der Pufferlösung durch die Trennkammer sind (wie bei jeder Strömung) Turbulenzen fast unvermeidlich. Lediglich bei sehr kleinen Strömungsquerschnitten kann man sich dem laminaren Strömungszustand in etwa nähern. Aber auch hierbei kommt es am Kammereinlaß und in besonderem Maße am Kammerauslaß zu turbulenten Vermischungen, wodurch das Trennergebnis entscheidend verschlechtert wird.

- Durch Elektrolyse des Wassers, die der Elektrophorese stets überlagert ist, kommt es an den Elektroden zur Gasbildung. Die dabei gebildeten Gasblasen stören den laminaren Strömungszustand in ganz erheblichem Maße und können zu nennenswerten Vermischungen innerhalb der Flüssigkeit führen.

Eine weitere wesentliche Schwierigkeit der Elektrophorese besteht darin, daß sehr hohe Spannungen (etwa 2500 Volt und mehr) verwendet werden müssen. Da die Stofftrennung auf unterschiedlichen Wanderungsge-

schwindigkeiten zwischen den Elektroden basiert, müssen Kathode und Anode in einem relativ großen Abstand (etwa 30 cm und mehr) voneinander angeordnet werden, um eine ausreichende Trennschärfe zu erzielen. Dadurch bildet die Flüssigkeit einen sehr großen Widerstand für den Stromfluß, der nur durch die Verwendung hoher Spannungen überwunden werden kann.

Bisher wurden eine Reihe unterschiedlicher Maßnahmen ergriffen, um die Hauptschwierigkeit der Elektrophorese, die Ausbildung von thermischen Konvektionsströmen, zu überwinden.

Eine effektive Maßnahme besteht darin, die Pufferlösung in einem Trägermedium zu fixieren. Zur Anwendung kommen vor allem poröse Schüttungen aus sehr feinen Partikeln, Papiere oder Gele (Bier, M.: Elektrophoresis: Theory, Methods and Applications, Academic Press Inc., London 1973). Die Verwendung der festen Trägerstoffe führt jedoch dazu, daß das Trennverfahren nur diskontinuierlich in chromatographieartiger Weise durchgeführt werden kann. Dadurch ist die Anwendbarkeit dieser sogenannten "Träger-Elektrophorese" auf Analysenzwecke begrenzt.

Bei der "Trägerfreien-Elektrophorese" lassen sich die thermischen Konvektionsströme durch intensives Kühlen über die Wände der Trennkammer vermindern. In hinreichendem Maße gelingt dies jedoch nur, wenn der Abstand der Deckplatten deutlich geringer als 1 mm ist (Hanning, K.: Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität, München 1964). Folglich eignet sich dieses Trennverfahren, das vorwiegend kontinuierlich betrieben wird, nur für sehr kleine Mengenströme.

Am effektivsten gelingt die Ausschaltung der thermischen Konvektion im schwerelosen Raum. Bei mehreren Weltraumflügen (z.B. von Apollo 14 im Jahre 1971 bis Spacelab D1 im Jahre 1985) wurden Experimente zur Elektrophorese durchgeführt, wobei Leistungssteigerungen bis zum Faktor 700 erzielt werden konnten (Jordan, H.L.: Weltraumforschung, DFVLR, Köln-Porz 1984).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die geschilderten Schwierigkeiten bei der Durchführung der Elektrophorese zu vermeiden.

Bei der erfindungsgemäßen Durchführung der Elektrophorese befinden sich im Trennraum zwischen den Elektroden zwei oder mehr miteinander nicht mischbare Flüssigkeiten, wobei Kathode und Anode in unterschiedlichen Phasen angeordnet sind. Bei dieser Anordnung wandern die elektrophoretisch beweglichen Moleküle oder Teilchen über die Phasengrenze in die andere Phase, während die anderen in der ursprünglichen Phase verbleiben. Auf diese Weise können Substanzen, die eine hinreichende elektrophoretische Beweglichkeit besitzen, aus einem vorgegebenen Flüssigkeitsgemisch abgetrennt werden.

Bei dieser Betriebsweise hat die zweite flüssige Phase die Aufgabe, die Moleküle oder Teilchen mit der hohen Wanderungsgeschwindigkeit einzufangen und eine Rückwanderung in die ursprüngliche Phase zu verhindern. Da die makroskopischen Strömungen, die durch die frei werdende Wärme oder durch Strömungsturbulenzen erzeugt werden, jeweils nur innerhalb einer einzelnen Phase wirken, sind sie für die elektrophoretische Trennung nicht mehr von Nachteil und brauchen daher nicht mehr unterdrückt zu werden. Sie können das Trennergebnis sogar positiv beeinflussen, da durch sie die übergehenden Substanzen in die Nähe der Phasengrenze transportiert werden und so einer Verarmung dieser Substanzen in dieser Zone entgegengewirkt wird.

Das elektrische Feld hat bei dieser Betriebsweise lediglich die Aufgabe, den Phasenübergang der elektrophoretisch beweglichen Teilchen zu bewirken.

Bei der erfindungsgemäßen Durchführung der Elektrophorese können Kathode und Anode in sehr geringem Abstand voneinander angeordnet werden. Es muß lediglich sichergestellt sein, daß sich die Phasengrenze dazwischen befindet. Auf diese Weise kann das Trennverfahren mit sehr viel kleineren Spannungen (z.B. 50 Volt oder weniger) durchgeführt werden.

In umfangreichen Versuchen wurde die Wirksamkeit der Zweiphasen-Elektrophorese getestet. Bei diesen Untersuchungen wurden zunächst zwei miteinander nicht mischbare wäßrige Flüssigkeiten eingesetzt. Es handelte sich um die Systeme Wasser-Dextran und Wasser-Polyäthylenglykol, wobei der Wassergehalt jeder Phase bei über 80 Gew.-% lag. Eine der beiden Phasen wurde mit einem Farbstoff, der eine hohe elektrophoretische Beweglichkeit besitzt, eingefärbt. Zur Anwendung kamen z.B. Säurefuchsin und Kresolrot.

Nach Anlegen der elektrischen Spannung konnte die Entfärbung der stoffabgebenden Phase und die Einfärbung der stoffaufnehmenden Phase visuell verfolgt werden. Die Untersuchungen demonstrierten sehr deutlich, daß das Überschreiten der Phasengrenze unter der Wirkung des elektrischen Feldes ohne weiteres möglich ist. Die Ausbildung einer Hemmung im Bereich der Phasengrenze wurde nicht beobachtet. Der elektrophoretische Stofftransport über die Phasengrenze ist nach den gemachten Beobachtungen sehr viel intensiver als der Transport aufgrund des Extraktionsgleichgewichtes zwischen den beteiligten Phasen. Dies bedeutet, daß in der aufnehmenden Phase eine sehr hohe Aufkonzentrierung der übergehenden Substanzen erfolgen kann.

In weiteren Untersuchungen wurde eine wäßrige und eine organische Phase (nButanol) verwendet. Der Phasenübergang des Farbstoffes war auch hier ohne weiteres möglich. Durch einfaches Umpolen der Elektroden konnte die Richtung des Stoffüberganges umgekehrt werden. Dabei zeigte sich, daß der Stofftransport aus der organischen Phase in die wäßrige wesentlich schneller erfolgt als in die entgegengesetzte Richtung.

Die erfindungsgemäße Zweiphasen-Elektrophorese läßt sich in unterschiedlicher Weise durchführen.

Fig. 2 zeigt eine Betriebsweise zur diskontinuierlichen Durchführung der Elektrophorese. Hierbei befindet sich die Phasengrenze 1 zwischen den beiden Elektroden 2 und 3. Diese sind in einem relativ kleinen Abstand voneinander angeordnet und netzartig gestaltet, so daß die Flüssigkeit sie ungehindert durchströmen kann. Um einer Verarmung der übergehenden Substanzen in der Nähe der Phasengrenze entgegenzuwirken kann eine (oder beide) Phase durch ein Rührorgan 4 innig vermischt werden. Die sich während der Elektrophorese bildenden Elektrolysegase werden bei 6 ausgeleitet. Der Kühlmantel 5 dient der Begrenzung des Temperaturanstiegs. Bei dieser Betriebsweise kann entweder die leichte oder die schwere Phase die stoffaufnehmende Phase sein. Diese Betriebsweise bietet sich an, wenn aus kleinen Flüssigkeitsmengen die Substanzen mit der gleichen elektrophoretischen Wanderungsrichtung abgetrennt werden sollen.

Fig. 3 zeigt eine Betriebsweise, bei der beide Flüssigkeiten 11 und 12 kontinuierlich zu- und abgeführt werden. Hierbei ist sowohl eine Gleichstromführung als auch eine Gegenstromführung der beteiligten Phasen möglich. Diese Betriebsweise ist vorteilhaft, wenn aus einer größeren Flüssigkeitsmenge Substanzen mit ein-

heitlicher elektrophoretischer Wanderungsrichtung abgetrennt werden sollen.

Fig. 4 zeigt eine Betriebsweise in Analogie zu Fig. 2 und Fig. 3, bei der drei Flüssigkeiten 11, 12, und 13 verwendet werden. Unter der Wirkung des elektrischen Feldes wandern Substanzen mit unterschiedlicher Richtung der elektrophoretischen Beweglichkeit in verschiedene Phasen. Auf diese Weise können z.B. aus der mittleren Phase 11 alle Substanzen, die eine merkliche elektrophoretische Beweglichkeit besitzen, abgetrennt werden.

Die Betriebsweisen gemäß Fig. 3 und Fig. 4 können in der Weise modifiziert werden, daß eine (Fig. 3) oder zwei (Fig. 4) Flüssigkeiten stationär im Apparat verbleiben. Im Laufe der Betriebszeit reichern sich die übergehenden Substanzen in diesen stationären Phasen an; sie werden dort also in hohem Maße aufkonzentriert. Eine eventuell erforderliche Regeneration der stationären Phasen läßt sich durch einfaches Umpolen der Elektroden bewerkstelligen. Dabei werden die aufkonzentrierten Stoffe kurzzeitig mit hoher Konzentration von der stetig strömenden Phase ausgeschleppt.

Fig. 5 zeigt eine chromatographieartige Betriebsweise in Analogie zur Gegenstromverteilung (Craig-Verteilung), wie sie bei der Solventextraktion durchgeführt wird. Hierbei durchströmt eine Pufferlösung 10 stetig die Apparatur, während die zweite Phase 12 stationär (z.B. in einem porösen Körper) vorliegt. Die zu zerlegende Probe 11 wird kurzzeitig der stetig strömenden Phase 10 zugegeben. Unter der Wirkung des elektrischen Feldes zwischen den Elektroden 2 und 3 wandern die Substanzen, die eine hohe elektrophoretische Beweglichkeit besitzen, in die stationäre Phase 12 und werden dort festgehalten; sie strömen dann also nicht mehr weiter. Durch Umpolung der Elektroden kehren sie nach einiger Zeit wieder in die stetig strömende Phase 10 zurück. Dieser Vorgang wird auf dem Wege durch die Apparatur mehrfach wiederholt. Diejenigen Substanzen, die keine elektrophoretische Beweglichkeit besitzen, durchströmen die Apparatur sehr schnell, da sie nie von der stationären Phase festgehalten werden. Die anderen Substanzen werden je nach dem Grad ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit mehr oder weniger lange in der stationären Phase verweilen; sie erreichen also den Apparateausgang wesentlich später. Auf diese Weise gelingt die vollständige Zerlegung eines Gemisches in Fraktionen von Substanzen mit unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit. Die dabei erzielte Trennung ist der bekannten Gaschromatographie vergleichbar. Im Gegensatz zur Gaschromatographie kann sie auch auf Makromoleküle, auf Kolloide, auf Bakterien und Zellen angewendet werden.

Bei der erfindungsgemäßen Durchführung der Elektrophorese kommt der Wahl der zweiten flüssigen Phase eine besondere Bedeutung zu. Sie soll in der Regel teilweise mit Wasser mischbar sein und eine hinreichende elektrische Leitfähigkeit besitzen. Zu beachten ist, daß die Wanderungsgeschwindigkeit vieler Spezies vom pH-Wert des Mediums, in dem sie sich befinden, abhängt. Bei einem bestimmten pH-Wert, dem sogenannten isoelektrischen Punkt, wird die Wanderungsgeschwindigkeit zu Null. Durch Einstellen unterschiedlicher pH-Werte in den beteiligten Phasen lassen sich einzelne Spezies in bestimmten Phasen anreichern. Dies kann zum Beispiel dadurch geschehen, daß die Substanzen zunächst in die zweite Phase übertragen werden und nach Umpolung der Elektroden (sowie eventueller pH-Wertänderung) wieder von der ursprünglichen Pha-

se aufgenommen werden. Diejenigen Substanzen, deren isoelektrischer Punkt dem pH-Wert der zweiten Phase entspricht, verbleiben dabei in dieser Phase. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Substanzen unter der Wirkung des elektrischen Feldes durch mehrere Phasen mit jeweils unterschiedlichem pH-Wert wandern zu lassen, wobei sich Substanzen mit unterschiedlichem isoelektrischen Punkt in der Phase mit dem entsprechenden pH-Wert anreichern.

Wie in den Vorversuchen festgestellt wurde, können unter der Wirkung des elektrischen Feldes die übergehenden Substanzen in der aufnehmenden Phase sehr stark angereichert werden. Unter Umständen wird dabei die Löslichkeitsgrenze überschritten, sodaß es zum Auskristallisieren dieser Substanzen kommt. Auf diese Weise können Stoffe in hochreiner, kristalliner Form aus verdünnten Lösungen abgetrennt werden.

Bei der erfindungsgemäßen Durchführung der Elektrophorese ist es sehr wichtig, daß die beiden Elektroden 2 und 3 vollkommen parallel zur dazwischenliegenden Phasengrenzfläche 1 angeordnet sind. Dies kann in einfacher Weise z.B. dadurch sichergestellt werden, daß als untere Elektrode 2 eine Quecksilberschicht verwendet wird, die sich aufgrund der Schwerkraft ebenso wie die Phasengrenzfläche völlig horizontal ausbildet. Die über der Phasengrenzfläche 1 befindliche Elektrode 3 kann entweder fest mit dem Gehäuse verbunden oder mittels nichtleitender Distanzelemente auf der Quecksilberschicht schwimmend eingebaut werden.

Die erfindungsgemäße Durchführung der Elektrophorese eröffnet die Möglichkeit dieses Trennverfahren zur Zerlegung von Stoffgemischen universeller als bisher anzuwenden. Insbesondere ist die Verarbeitung größerer Stoffmengen im industriellen Maßstab möglich. Ein wichtiges Anwendungsgebiet dürfte im Bereich der Biotechnologie liegen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Stofftrennung mittels Elektrophorese, bei welchem in einer Trennkammer mit wenigstens zwei in einer Flüssigkeit befindlichen Elektroden durch Anlegen einer elektrischen Gleichspannung eine Wanderung geladener Moleküle (bzw. Teilchen) erfolgt, **dadurch gekennzeichnet**, daß zusätzlich zur ersten Flüssigkeit wenigstens eine zweite Flüssigkeit, die mit der ersten nicht vollständig mischbar ist, eingesetzt wird und die sich dadurch ausbildende Phasengrenze zwischen den Elektroden liegt und daß der Stofftransport unter der Wirkung des elektrischen Feldes über mindestens eine Phasengrenze erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Flüssigkeiten stetig der Trennkammer zugeführt und stetig aus der Trennkammer abgeführt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens eine der Flüssigkeiten stationär in der Trennkammer verbleibt, wobei diese sowohl die stoffabgebende als auch die stoffaufnehmende Flüssigkeit sein kann.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Flüssigkeiten diskontinuierlich der Trennkammer zugeführt werden und nach Abschluß der Stofftrennung diskontinuierlich aus der Trennkammer abgezogen werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Flüssigkeiten im Gleichstrom

zueinander die Trennkammer durchströmen.

6. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Flüssigkeiten im Gegenstrom zueinander die Trennkammer durchströmen.
7. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die beteiligten Flüssigkeiten unterschiedliche pH-Werte haben.
8. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß in der stoffaufnehmenden Flüssigkeit die Löslichkeitsgrenze überschritten wird, so daß die übergehenden Substanzen auskristallisieren.
9. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Stofftransportrichtung durch Umpolen der Elektroden einmal oder mehrmals umgekehrt wird.
10. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß während der Durchführung der Elektrophorese, insbesondere vor dem Umpolen der Elektroden, der pH-Wert einer oder mehrerer Flüssigkeiten durch Zugabe einer Lauge oder einer Säure geändert wird.
11. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 10 bestehend aus einer Trennkammer, die wenigstens zwei Elektroden enthält, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (2, 3) in unterschiedlichen, nicht voll miteinander mischbaren Flüssigkeiten angeordnet sind.
12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (2, 3) in Bezug zur Länge der Trennkammer in einem geringen Abstand, vorzugsweise 5 bis 20 mm, zueinander angeordnet sind.
13. Vorrichtung nach wenigstens einem der Ansprüche 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß die untere Elektrode (2) aus einer Quecksilberschicht besteht, während die obere Elektrode (3) entweder fest mit dem Gehäuse verbunden oder mittels nichtleitender Distanzelemente auf der Quecksilberschicht schwimmend eingebaut ist.
14. Vorrichtung nach wenigstens einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens eine der beteiligten flüssigen Phasen in einem Trägermedium, vorwiegend einem porösen Festkörper, fixiert ist.

Hierzu 2 Blatt Zeichnungen

Fig. 3

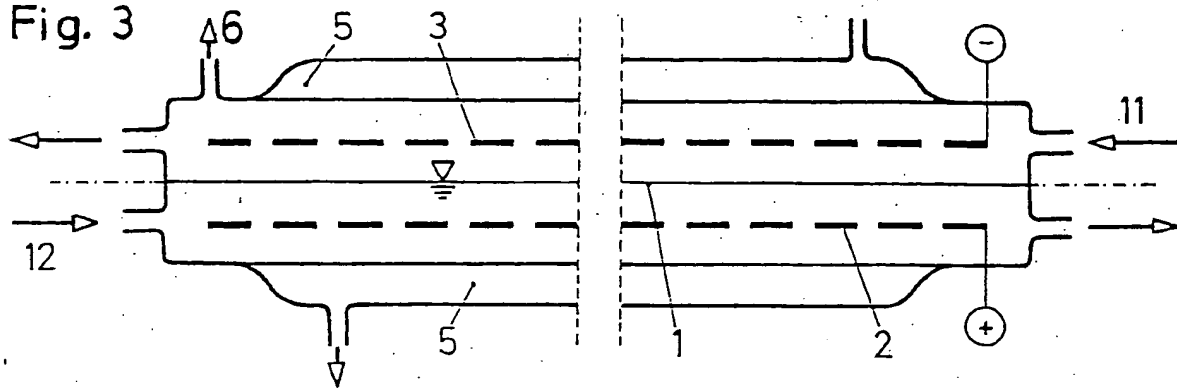


Fig. 4

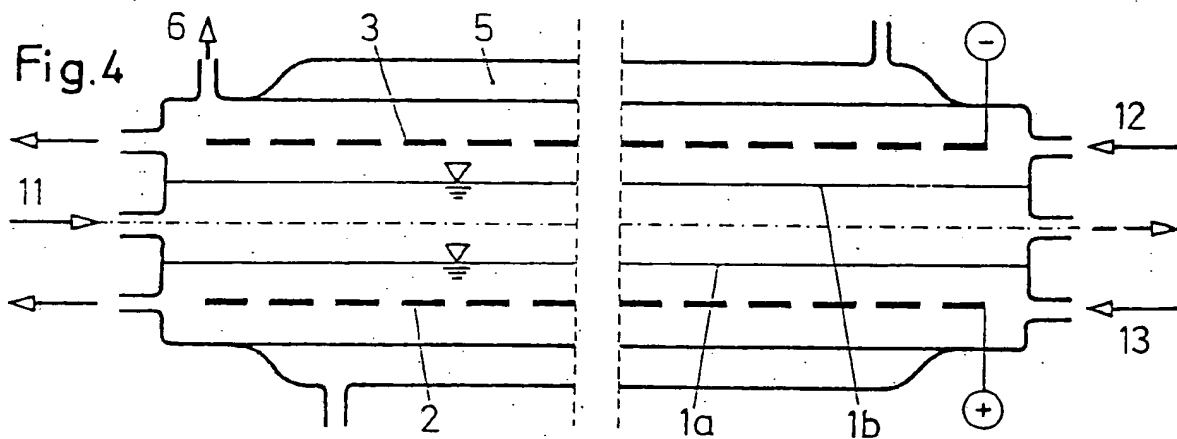


Fig. 5

